昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, April 2012, 55(4): 412 –419 ISSN 0454-6296

杠柳新苷 P 和 E 对东方粘虫和小地老虎幼虫中肠蛋白酶活性的影响

陈翠翠，高履桐，师宝君，温万东，胡兆农*，吴文君
（陕西省植物源农药研究与开发重点实验室，陕西杨凌 712100）

摘要：从杀虫植物杠柳 *Periploca sepium* Bunge 根皮中分离得到的杠柳新苷 P 具有很高的杀虫活性，为了探索其杀虫机理，采用经典的昆虫蛋白酶活性测定方法，比较研究了杠柳新苷 P 和无杀虫活性的杠柳新苷 E 对东方粘虫 *Mythimna separata* 与小地老虎 *Agrotis ypsilon* 6 龄幼虫中肠类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性的影响。结果表明：对东方粘虫弱碱性类胰蛋白酶，杠柳新苷 P 表现出强激活作用(酶活性为对照的 3.43 倍)，激活时间可长达 8 h，而杠柳新苷 E 则无明显激活作用。杠柳新苷 P 和 E 对东方粘虫弱碱性类胰蛋白酶活性的影响二者差异显著(P = 0.01)，杠柳新苷 P 药后 2，4 和 8 h，东方粘虫中肠弱碱性类胰蛋白酶的活性分别是杠柳新苷 E 药后的 15.4，106.8和 242.7 倍。酶活性测定结果还表明，与东方粘虫相比，小地老虎中肠类胰蛋白酶活性相对较低，且杠柳新苷 P 的激活作用也较弱，这可能是杠柳新苷 P 对东方粘虫具杀虫活性，而小地老虎对其不敏感的原因之一；另外，杠柳新苷 P 和 E 对试虫中肠类凝乳胰蛋白酶活性均无明显影响。据此推测，杠柳活性成分新苷 P 对东方粘虫中肠弱碱性类胰蛋白酶的激活作用可能是造成试虫中毒的机理之一。

关键词：东方粘虫；小地老虎；植物杀虫剂；杠柳新苷 P；杀虫作用；类胰蛋白酶；酶活性
中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)04-0412-08

Effects of periplocosides P and E from *Periploca sepium* on the proteinase activities in the midgut of larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* (Lepidoptera: Noctuidae)

CHEN Cui-Cui, GAO Lü-Tong, SHI Bao-Jun, WEN Wan-Dong, HU Zhao-Nong*, WU Wen-Jun
(Shaanxi Key Laboratory of Research and Development of Botanical Pesticides, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Periplocoside P, which was isolated from the root bark of the insecticidal plant *Periploca sepium* Bunge, has strong insecticidal activity. To explore the insecticidal mechanism of periplocoside P, the classical determination methods for insect protease activity were used to compare the different effects on the activities of trypsin-like protease and chymotrypsin-like protease in the midgut of the 6th instar larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* beween periplocoside P and periplocoside E which has no insecticidal activity. The results showed that periplocoside P displayed strong activation effect on the weakly alkaline trypsin-like protease activity in the midgut of *M. separata* larvae, which was 3.43 times as high as the control, and the activation time last up to 8 h; while periplocoside E did not show any activation effect. Significant differences at the 0.01 level between the effects of periplocosides P and E on the weakly alkaline trypsin-like protease activity of *M. separata* larvae were observed. At 2 h, 4 h and 8 h after treatment, the weakly alkaline trypsin-like protease activity in the midgut of *M. separata* larvae treated by periplocoside P were 15.4, 106.8 and 242.7 times as high as that in the midgut of *M. separata* larvae treated by periplocoside E. The results of protease activity determination also showed that the trypsin-like protease activity in the midgut of *A. ypsilon* larvae was relatively low, and the activation effect of periplocoside P on trypsin-like protease was also weak, compared to that on *M. separata*, which may be one of the factors that periplocoside P had insecticidal activity against *M. separata*, while *A. ypsilon*

基金项目：国家公益性行业(农业)科研专项(200903052)；国家自然科学基金项目(31171868，31071704)；中央高校基本科研业务费专项资金(QN2011058，QN2009031)
作者简介：陈翠翠，女，1986 年生，河南濮阳人，硕士研究生，主要从事农药毒理学研究，E-mail：lovelycui29@163.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail: huzhaonong@nwsuaf.edu.cn
收稿日期 Received: 2011-11-13；接受日期 Accepted: 2012-03-26

was insensitive to it. In addition, periplocosides P and E showed no obvious effect on chymotrypsin-like protease activity in the midgut of the tested insects. It is so inferred that the activation of the weakly alkaline trypsin-like protease in the midgut of *M. separata* may be one of the factors that periplocoside P causes toxicity to insects.

Key words: *Mythimna separata*; *Agrotis ypsilon*; botanical insecticide; periplocoside P; insecticidal action; trypsin-like protease; enzyme activity

昆虫的消化系统是昆虫对食物进行消化、吸收的主要场所，对消化系统组织结构的破坏或对消化酶系的干扰必将导致昆虫生长发育受阻乃至死亡(吴文君等，1997)。Christeller 等(1992)研究表明鳞翅目昆虫幼虫中肠蛋白酶大都属于丝氨酸蛋白酶类，在肠体内食物蛋白水解过程中充当着重要角色。而鳞翅目幼虫中肠蛋白酶主要由类胰蛋白酶和类凝乳蛋白酶组成(Milne and Kaplan,1993)。对试虫中肠蛋白酶的研究一直是毒理学研究的热点，Broadway 和 Duffey (1986)报道大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI)和马铃薯蛋白酶抑制剂 (potato inhibitor Ⅱ, PI-2)分别在 0.18 g/L 和 0.08 g/L 的浓度下就能抑制美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* (Boddie)和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)幼虫中肠绝大部分胰蛋白酶活性；张兴和赵善欢(1992)报道了川楝素对菜青虫 *Pieris rapae* 中肠蛋白酶活性有一定的抑制作用；操海群等(2006)报道竹提取物对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠蛋白酶和淀粉酶的活性均有不同程度的激活作用,而对脂肪酶活性影响不大。当前虽有许多报道，但主要仍是集中于对蛋白酶的抑制作用，除 Bt 内毒素以外，尚未有作用于昆虫消化系统的商品化杀虫剂。

朱九生等(2004)及史清华等(2005)报道了杠柳根皮提取物的杀虫活性；西北农林科技大学农药研究所近年来对杠柳根皮的杀虫活性成分及杀虫活性进行了较系统的研究(李奕，2006；赵彦超，2008；何玲等，2010)。结果表明，杠柳根皮的杀虫活性成分可能作用于昆虫消化系统，特别是昆虫中肠消化酶。杠柳新苷 P 是采用生物活性追踪方法从杠柳根皮中分离得到的具有杀虫活性的新化合物(结构鉴定另文报道)。试虫取食杠柳新苷 P 处理的叶片后会出现典型中毒症状：腹部膨大发黑，腹足不能正常伸缩，身体不能自然弯曲，并在 48 h 左右中毒死亡，与杠柳新苷 NW 和杠柳活性组分 F3-28 中毒症状相同。何玲等(2010)研究了杠柳活性组分对粘虫 *Mythimna separata* 中肠消化酶：蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶的影响，结果表明杠柳活性组分对粘虫中肠类胰蛋白酶的激活作用可能是导致试虫中毒死亡的机理之一，具体是何种成分起了激活作用，尚未见报道。杠柳新苷 P 和杠柳新苷 E 都属于杠柳新苷类化合物，分子量相近，分别为 1 279 和 1 293，结构上仅有一个基团不同(图 1)，杠柳新苷 P 对东方粘虫表现出强烈的胃毒活性，对小地老虎 *Agrotis ypsilon* 即使高剂量处理也无明显作用，而杠柳新苷 E 对东方粘虫和小地老虎均无杀虫活性。因此，本研究以具杀虫活性的杠柳新苷 P 为供试化合物，以无杀虫活性的杠柳新苷 E 作对比，比较研究了二者对东方粘虫和小地老虎幼虫中肠类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性的影响，旨在初步探索杠柳新苷 P 的杀虫作用机理。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

粘虫 *M. separata* 6 龄幼虫和小地老虎 *A. ypsilon* 6 龄幼虫，均由西北农林科技大学农药研究所提供，常规方法饲养,即养虫室内 22 ~25℃、相对湿度为 70%~80% 条件下，分别以小麦(玉米)叶和甘蓝叶饲养粘虫和小地老虎幼虫。实验时挑取整齐一致的 6 龄试虫。

1.2　主要仪器及试剂

1.2.1　主要仪器：MK3 型酶标仪(美国热电上海仪器有限公司产品)，TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂产品)，420A 型电热恒温水箱(北京科伟永鑫实验仪器设备厂产品)

1.2.2　主要试剂：杠柳新苷 P 和杠柳新苷 E，纯度均在 95% 以上，由西北农林科技大学农药研究所提供，实验时分别配成 2% 的丙酮溶液。苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulphonyl fluoride, PMSF)、Na-苯甲酰-DL-精氨酸-*p*-硝基苯(Na-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide, BAPNA)、*p*-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(*p*-tosyl-L-arginine methyl ester, TAME)、N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯(N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, BTEE)、Tris base、甘氨酸、牛血清白蛋白、考马斯

杠柳新苷 P Periplocoside P: R_1 = OH, R_2 = H

杠柳新苷 E Periplocoside E: R_1 = H, R_2 = OCH_3

图 1 杠柳新苷 P 和 E 的母体结构

Fig. 1 The parent structure of periplocosides P and E

亮蓝均为美国 Sigma 公司产品，其他试剂均为国产分析纯。所用试剂均用超纯水配制。

1.3 试虫处理

采用载毒叶片饲喂法。挑选生长发育一致的 6 龄粘虫和小地老虎于 24 孔板中，每孔放置一头，饥饿 24 h。分为 2 组，组Ⅰ为杠柳新苷 P 及空白对照组；组Ⅱ为杠柳新苷 E 及空白对照组；各组的处理组，分别点涂 1 μL 质量分数 2% 的杠柳新苷 P(或杠柳新苷 E)丙酮溶液于小麦和甘蓝叶片(约 0.5 cm × 0.5 cm)上，小麦叶片饲喂粘虫，甘蓝叶片饲喂小地老虎，待丙酮挥发后，将小麦叶片放入 24 孔板中，每头试虫一张叶片。各组的对照组试虫，饲喂点涂 1 μL 丙酮的叶片。分别取取食后 2，4，8，12，24 和 48 h 的试虫及相应对照试虫各 20 头，用于酶液制备。每处理重复 3 次。

1.4 中肠酶液的制备

各供试试虫在冰盘上(4℃)迅速解剖，用预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲去体液，截取中肠，去除围食膜供试。将供试的中肠组织于预冷的玻璃匀浆器中加入少量预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液，在冰浴内匀浆。匀浆液于 12 000 r/min 冷冻离心 15 min，取上清液作为酶提取液。

1.5 酶活性测定

参照王琛柱和钦俊德(1996)以及 Ortego 等(1996)的测定方法，每处理重复 3 次。

1.5.1 类胰蛋白酶活性测定：采用两种专性底物：BAPNA 和 TAME。强碱性胰蛋白酶活性测定以 BAPNA 为底物，弱碱性类胰蛋白酶活性测定以 TAME 为底物。BAPNA 以 10 mg/mL 溶于二甲基亚砜，取 40 μL 加入含中肠酶液的 0.5 mL 0.1 mol/L pH 10.5 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中，反应 20 min 后，加入 0.5 mL 30% (v/v) 乙酸终止反应，在 405 nm 测光吸收值。TAME 以 2 mmol/L 溶于0.15 mol/L NaCl 溶液中。取该液 0.25 mL 加入0.25 mL 含中肠酶液的 0.1 mol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液，测定 5 min 内在 247 nm 下光吸收变化值，每隔 30 s 读数一次。BAPNA 和 TAME 的摩尔消光系数分别为 8 800 L/mol · cm 和 540 L/mol · cm。

1.5.2 类胰凝乳蛋白酶活性测定：以 BTEE 为底物。BTEE 以 1 mmol/L 溶于含 10% (v/v) 甲醇的 0.15 mol/L NaCl 溶液中，取该液 0.25 mL 加入 0.25 mL含中肠酶液的 0.1 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液。测定 5 min 内在 256 nm 下光吸收变化值，每隔 30 s 读数一次。BTEE 的摩尔消光系数为 964 L/mol · cm。

1.6 蛋白含量的测定

蛋白含量的测定参照 Bradford(1976)法，使用牛血清蛋白作为标准蛋白，每个处理重复 9 次。

1.7 数据统计与分析

本实验中所有数据均采用 SPSS 10.0 中文版进行处理和分析，采用 Duncan 氏新复极差法检验各组酶比活力之间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 杠柳新苷 P 和 E 对粘虫和小地老虎强碱性类胰蛋白酶活性的影响

由图 2(A)可知，粘虫取食杠柳新苷 P 处理的叶片后 2 h，中肠强碱性类胰蛋白酶出现明显的激

活作用，激活率为28.9%。随后便无激活作用，并于12 h 开始表现出抑制作用，12，24 和48 h 抑制作用逐渐增强，抑制率分别为20.95%，43.06%和63.07%，Duncan 氏新复极差法检验，在0.01 水平上均表现出极显著差异。杠柳新苷 P 对小地老虎强碱性类胰蛋白酶在2 h 时表现激活作用，酶活性为对照的1.32 倍，但药后4 h 的酶比活力没有变化，8 h 后出现抑制作用，且抑制作用逐渐减弱，24 h 后抑制作用消失；由图中可看出，对照组小地老虎强碱性类胰蛋白酶活性相对于粘虫比较低，且时间依赖性不强，故小地老虎自身强碱性类胰蛋白酶的低激活性和强代谢能力可能使其对杠柳新苷 P 不敏感。

由图2(B)可知，杠柳新苷 E 处理粘虫各时间段后，强碱性类胰蛋白酶活性逐渐下降，药后8 h 表现出抑制作用，8，12，24 和48 h 后的抑制率分别为22.08%，22.57%，23.17% 和52.05%，Duncan 氏新复极差法检验，在0.01 水平上均表现出极显著差异。但并未对粘虫强碱性胰蛋白酶表现出激活作用；杠柳新苷 E 处理后各时间段小地老虎中肠强碱性类胰蛋白酶与对照没有显著差异。

表1 比较了杠柳新苷 P 和 E 两种化合物对粘虫强碱性类胰蛋白酶的差异，可看出，杠柳新苷 P 和 E 对药后各时间段粘虫胰蛋白酶活性的影响存在显著差异。室内生物测定结果表明，杠柳新苷 E 对粘虫没有毒杀活性，而杠柳新苷 P 对粘虫有毒杀作用。可推测，粘虫中毒症状的出现可能与杠柳新苷 P 对中肠强碱性胰蛋白酶的激活作用有关。

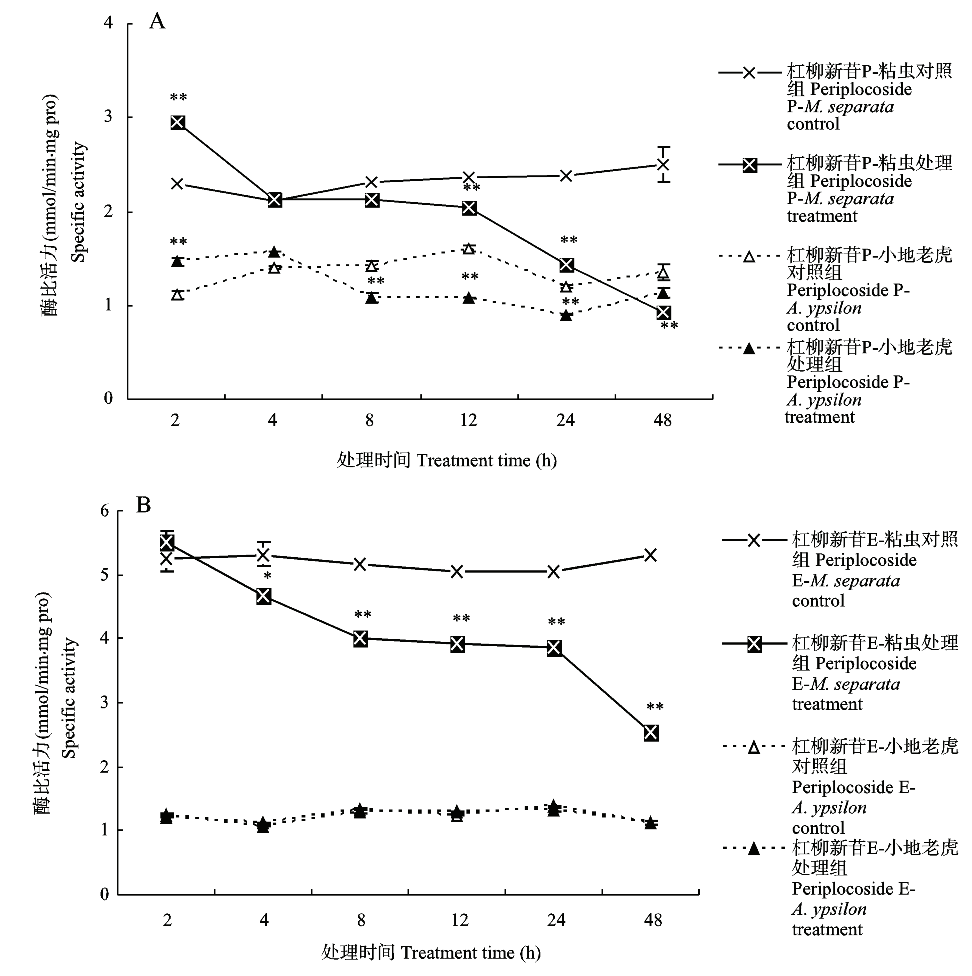


图2　杠柳新苷 P(A)和 E(B)处理不同时间后粘虫和小地老虎6 龄幼虫中肠强碱性胰蛋白酶活性的变化

Fig. 2　Changes in strong alkaline trypsin-like protease activity in the midgut of the 6th instar larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* after treatment with periplocosides P (A) and E (B) for different time

* 各试虫处理组与对照组经 Duncan 氏新复极差检验差异显著($P<0.05$) Significant difference between treatment group and control group for each test insect by Duncan's New Multiple Range test ($P<0.05$)；** 各试虫处理组与对照组经 Duncan 氏新复极差检验差异极显著($P<0.01$) Extremely significant difference between treatment group and control group for each test insect by Duncan's New Multiple Range test ($P<0.01$). 图3 和4 同 The same for Figs. 3 and 4.

表 1 杠柳新苷 P 和 E 处理不同时间后对粘虫 6 龄幼虫中肠强碱性类胰蛋白酶活性的影响

Table 1 Effect of periplocosides P and E on strong alkaline trypsin-like protease activity in the midgut of the 6th instar larvae of *Mythimna separata*

化合物 Compounds	酶比活力激活率 Activation rate of specific activity (%)					
	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
杠柳新苷 E Periplocoside E	−2.23 ± 2.41	−8.65 ± 0.67	−22.08 ± 0.59	−22.57 ± 0.42	−23.17 ± 1.91	−52.05 ± 0.63
杠柳新苷 P Periplocoside P	28.90 ± 1.10 **	0.02 ± 0.07 **	−3.26 ± 1.53 **	−20.95 ± 1.15	−43.06 ± 1.17 **	−63.07 ± 1.91 **

表中数据为 3 次结果的平均值 ± 标准误 Data are represented as mean ± *SE* for 3 repeats. −：抑制作用 Inhibition. * Duncan 氏新复极差检验同列数据间差异显著($P<0.05$) Significant difference between the data in the same column by Duncan's New Multiple Range test ($P<0.05$)；** Duncan 氏新复极差检验同列数据间差异极显著($P<0.01$) Extremely significant difference between the data in the same column by Duncan's New Multiple Range test ($P<0.01$). 表 2 同 The same for Table 2.

2.2 杠柳新苷 P 和 E 对粘虫和小地老虎弱碱性类胰蛋白酶活性的影响

由图 3(A)可知，杠柳新苷 P 对粘虫弱碱性类胰蛋白酶在药后 2 – 8 h 时表现出明显的激活作用，激活率分别为 167.78%，96.09% 和 242.70%，酶比活力分别是对照的 2.69，1.96，3.43 倍，药后 12 h 表现出抑制作用，药后 24 和 48 h 的酶活性与对照没有差异；杠柳新苷 P 对小地老虎强弱性类胰蛋白酶在 2 h 时有激活作用，酶比活力为对照的 1.83倍，但随后便检测不到激活作用；由图中酶比活力大小可看出，与东方粘虫相比，小地老虎中肠类胰蛋白酶活性相对较低，且杠柳新苷 P 的激活作用也较弱，这可能是杠柳新苷 P 对东方粘虫具杀虫活性，而小地老虎对其不敏感的原因之一。

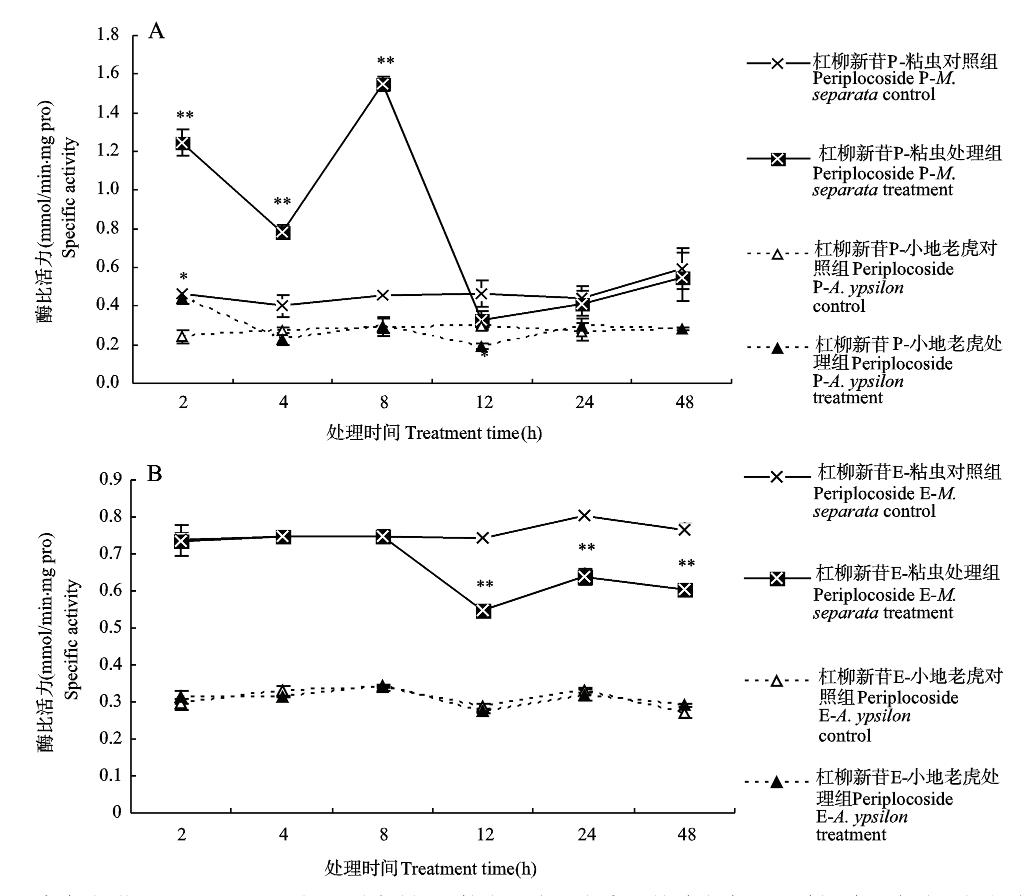


图 3 杠柳新苷 P(A)和 E(B)处理不同时间后粘虫和小地老虎 6 龄幼虫中肠弱碱性胰蛋白酶活性的变化

Fig. 3 Changes in weak alkaline trypsin-like protease activity in the midgut of 6th instar larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* after treatment with periplocosides P (A) and E (B) for different time

由图 3(B)可知，杠柳新苷 E 对粘虫弱碱性胰蛋白酶活性的影响不明显，没有出现激活作用，只在 12 h 后对粘虫强碱性类胰蛋白酶活性表现抑制作用；杠柳新苷 E 对小地老虎强弱碱性类胰蛋白酶活性没有影响。

从表 2 可看出，杠柳新苷 E 和杠柳新苷 P 对粘虫药后 2，4，8，12 h 中肠弱碱性胰蛋白酶活性的影响存在极显著差异；杠柳新苷 P 对粘虫弱碱性类胰蛋白酶的比活力激活率分别是杠柳新苷 E 的 15.4，106.8 和 242.7 倍。

2.3　杠柳新苷 P 和 E 对粘虫和小地老虎类胰凝乳蛋白酶活性的影响

由图 4(A)和(B)可知，杠柳新苷 P 和 E 均对粘虫和小地老虎的类凝乳胰蛋白酶活性没有显著影响，与空白对照相当。

表 2　杠柳新苷 P 和 E 对粘虫 6 龄幼虫中肠弱碱性类胰蛋白酶活性的影响

Table 2　Effect of periplocosides P and E on weak alkaline trypsin-like protease activity in the midgut of the 6th instar larvae of *Mythimna separata*

化合物 Compounds	酶比活力激活率 Activation rate of specific activity (%)					
	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
杠柳新苷 E Periplocoside E	10.87 ±2.38	0.90 ±1.66	−0.07 ±1.77	−26.31 ±1.27	−20.42 ±2.76	−21.18 ±1.98
杠柳新苷 P Periplocoside P	167.78 ±15.05 **	96.09 ±8.16 **	242.70 ±8.94 **	−65.84 ±4.71 **	−6.55 ±14.69	−30.76 ±15.71

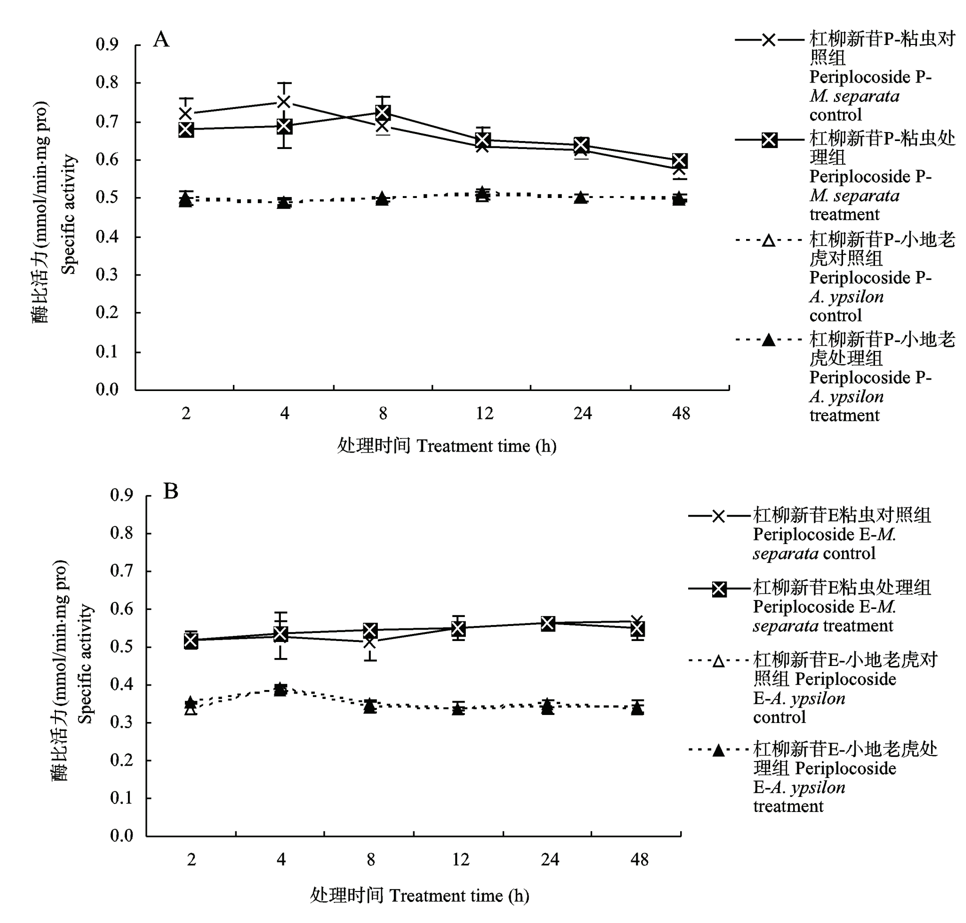


图 4　杠柳新苷 P(A)和 E(B)处理不同时间后粘虫和小地老虎 6 龄幼虫类胰凝乳蛋白酶活性的变化

Fig. 4　Changes in chymotrypsin-like protease activity of 6th instar larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* after treatment with periplocosides P (A) and E (B) for different time

3 结论与讨论

类胰蛋白酶是鳞翅目中肠主要消化酶，目前新农药的研究，主要集中在对胰蛋白酶的抑制作用研究，即从植物、动物中寻找胰蛋白酶抑制剂，或将胰蛋白酶抑制剂基因转到作物上，以此控制害虫。例如：McManus 和 Burgess（1995）观察到 50 mg/L 的 STI 能抑制斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫肠道 88% 的胰蛋白酶活性；Johnson 等（1989）将马铃薯蛋白酶抑制剂 PI-1 和 PI-2 以及番茄蛋白酶抑制剂基因转入烟草，就能明显抑制烟草天蛾幼虫的生长。

Broadway 和 Duffey(1986)以 TAME 为底物测定了美洲棉铃虫和甜菜夜蛾长期取食大豆胰蛋白酶抑制剂后中肠内类胰蛋白酶的变化，发现该种酶活性显著增高。王琛柱等(1995)研究表明，棉铃虫长期取食含低浓度的大豆胰蛋白酶抑制剂时，强碱性类胰蛋白酶活力显著降低，弱碱性类胰蛋白酶活力显著增强。本研究结果显示，饲喂带药叶蝶 2 –48 h 后，粘虫强碱性类胰蛋白酶在药后 2 h 表现出 28.3% 的激活率，药后 8 h 后抑制作用逐渐增强，抑制率高达 63.07%；而对粘虫弱碱性类胰蛋白酶表现出显著的激活作用，激活时间长达 8 h，激活倍数高达 3.43 倍。这与王琛柱等(1995)的抗营养效应相似，蛋白酶抑制剂对昆虫抗营养效应在于它对蛋白酶的激活和抑制作用，从而导致各种蛋白酶间的协调性破坏，昆虫消化过程受阻，影响生长发育。但是本研究中，杠柳新苷 E 也能明显抑制粘虫强碱性和弱碱性类胰蛋白酶活性，但并未表现出中毒症状，且杠柳新苷 E 和杠柳新苷 P 对粘虫强碱性和弱碱性类胰蛋白酶活性的影响表现出显著差异；杠柳新苷 P 能毒杀粘虫，说明该药剂对粘虫弱碱性胰蛋白酶具有激活作用，这可能是导致粘虫中毒死亡的机理之一。

综上所述，推测杠柳新苷 P 对粘虫中肠弱碱性类胰蛋白酶显著的激活作用可能是造成粘虫中毒死亡的机理之一，也可能是杠柳新苷 P 对粘虫强碱性类胰蛋白酶的强抑制作用和对弱碱性类胰蛋白酶的强激活作用相互影响，造成粘虫中肠消化系统紊乱，使粘虫中毒死亡。然而杠柳新苷 P 具体是如何激活试虫类胰蛋白酶，仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 –254.

Broadway RM, Duffey SS, 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32(10): 827 –833.

Cao HQ, Yue YD, Peng ZH, Hua RM, Tang F, 2006. Effects of bamboo extracts on the activities of several enzymes in *Helicoverpa armigera* larvae. *Scientia Silvae Sinicae*, 42(7): 145 –148. [操海群，岳永德，彭镇华，花日茂，汤锋，2006. 竹提取物对棉铃虫幼虫体内几种酶系活性的影响. 林业科学，42(7): 145 –148]

Christeller JT, Laing WA, Markwick NP, Burgess EPJ, 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22(7): 735 –746.

He L, Zhao J, Shi BJ, Hu ZN, Wu WJ, 2010. Effects of insecticidal fraction F3-28 from *Periploca sepium* on the activities of digestive enzymes in the midgut of larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(11): 1248 –1255. [何玲，赵娟，师宝君，胡兆农，吴文君，2010. 杠柳杀虫组分 F3-28 对东方粘虫和小地老虎幼虫中肠消化酶活性的影响. 昆虫学报，53(11): 1248 –1255]

Johnson R, Narraez J, An G, Ryan C, 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(24): 9871 –9875.

Li Y, 2006. Study on Insecticidal Constituents from *Periploca sepium* Bunge. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [李奕，2006. 杠柳杀虫活性成分研究. 陕西杨凌：西北农林科技大学硕士学位论文]

McManus MT, Burgess EPJ, 1995. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.*, 41(9): 721 –738.

Milne R, Kaplan H, 1993. Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23(6): 663 –673.

Ortego F, Novillo C, Castanera P, 1996. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32: 163 –180.

Shi QH, Ma YM, Qin HQ, 2005. Preliminary study on chemical composition and insecticidal activity of root bark from *Periploca sepium*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 14(6): 141 –144. [史清华，马养民，秦虎强，2005. 杠柳根皮化学成分及杀虫活性的初步研究. 西北农业学报，14(6): 141 –144]

Wang CZ, Qin JD, 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7 –14. [王琛柱，钦俊德，1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报，39(1): 7 –14]

Wang CZ, Xiang XF, Zhang SF, Qin JD, 1995. Effect of soybean

trypsin inhibitor on the growth and digestive physiology of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 38(3): 272 - 277. [王琛柱，项秀芬，张书芳，钦俊德，1995. 大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响. 昆虫学报，38(3): 272 - 277]

Wu WJ, Ji ZQ, Hu ZN, 1997. Natural product and digestion toxicant. *Pesticides*, 36(6): 6 - 8. [吴文君，姬志勤，胡兆农，1997. 天然产物与消化毒剂. 农药，36(6): 6 - 8]

Zhang X, Zhao SH, 1992. Effects of toosendanin on several enzyme systems of the cabbage worm (*Pieris rapae* L.). *Acta Entomologica Sinica*, 35(2): 171 - 177. [张兴，赵善欢，1992. 川楝素对菜青虫体内几种酶系活性的影响. 昆虫学报，35(2): 171 - 177]

Zhao YC, 2008. Study on the Separation, Insecticidal Activity and Mechanism of Periplocoside NW. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [赵彦超，2008. 杠柳毒素 NW 的分离、杀虫活性及其作用机理初步研究. 陕西杨凌：西北农林科技大学硕士学位论文]

Zhu JS, Qiao XW, Wang J, Qin S, 2004. Study on antifeedant and insecticidal activities of extracts and fractions from *Periploca spepium* Bunge against *Plutella xylostella* (L.). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 6(2): 48 - 52. [朱九生，乔雄梧，王静，秦曙，2004. 杠柳的不同溶剂提取分离物对小菜蛾幼虫的拒食和毒杀作用. 农药学学报，6(2): 48 - 52]

（责任编辑：赵利辉）